

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 2 月 6 日 (06.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/009870 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 39/395, 45/00, A61P 35/00 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07548
- (22) 国際出願日: 2002 年 7 月 25 日 (25.07.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-224596 2001 年 7 月 25 日 (25.07.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市中央区平野町二丁目 6 番 9 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 細川 斉子 (HOSOKAWA, Saiko) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP). 二木 寿枝 (NIKI, Hisae) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES FOR MAMMARY CANCER

(54) 発明の名称: 乳癌治療薬

(57) Abstract: It is intended to provide tissue-specific remedies for cancer which exert a therapeutic effect on mammary cancer. A human monoclonal antibody containing the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:1, 2 and 3 in Sequence Listing in the hyper-variable region of the heavy chain and further containing the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:4, 5 and 6 in Sequence Listing in the hyper-variable region of the light chain is associated with an antitumor substance by, for example, bonding the antibody to a liposome having the antitumor substance encapsulated therein.

(57) 要約:

乳癌に対し治療効果のある癌組織特異的な癌治療薬を提供する。重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含むヒトモノクローナル抗体と抗腫瘍性物質とを、当該抗腫瘍性物質を封入したリポソームに当該抗体を結合させる等により会合させる。

WO 03/009870 A1



— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書  
乳癌治療薬

技術分野

- 5       本発明は、乳癌治療薬に関するものである。

背景技術

- 10       抗体の特異的な反応性を利用して、抗腫瘍性物質等の薬剤を抗体との複合体として投与し、抗腫瘍性物質を癌組織に集積させる方法が開発されている。例えば、薬剤を修飾することなく大量に運ぶ手段として、リボソームに薬剤を封入しその表面に抗体を結合したもの、すなわち抗体結合リボソームが提案されており、その優れた抗腫瘍効果が多数報告されている。(今野ら、Cancer Research 47, 4471 (1987)、橋本ら、  
15       特開昭 58-13403 号公報)。

- 癌組織に対する抗体として、胃癌及び大腸癌との反応性からスクリーニングされたヒトモノクローナル抗体であるGAH抗体が知られている(特開平 4-346918 号及び特開平 5-304987 号各号公報)。しかしながら、一般に抗体とは抗原に対する特異性が極めて高いものであり、胃癌及び大腸癌との  
20       反応性からスクリーニングされたGAH抗体の、他の癌との反応性を予測することは当業者でも困難である。

- また、乳癌をターゲットとした抗体医薬としては、HER2(human epidermal growth factor receptor 2)に対する抗体(国際公開 WO 89/6692 号公報参照)が現在開発されているが、この抗体は、もともとマウス由来のモノクローナル抗体として取得されたものを、さらに遺伝子組換え法によりヒト化したものであり、超可変領域はマウス由来である。このように、既知抗原をマウスに免役して得られた抗体であれば、  
25

in situ ハイブリダイゼーション法などを用いて抗原そのものの分布を確認し癌種を特定することも容易であるが、純粋なヒト由来のモノクローナル抗体の場合、マウス由来の抗体とは異なり、抗原そのものの分布を確認することや癌種を特定することが困難である。

#### 発明の開示

本発明の課題は、乳癌に対しても効果のある癌組織特異的な癌治療薬を提供することである。

10 本発明者らは、GAH抗体が、胃癌、大腸癌などの消化器系の癌種以外に、乳癌にも反応性がある、幅広い特異性をもつ抗体であること、及び、この抗体に抗腫瘍性物質を会合させたものにより乳癌の増殖が有効に抑制されることを見出し、本発明を完成した。

15 すなわち本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含むヒトモノクローナル抗体と、この抗体に会合した抗腫瘍性物質とを含む乳癌治療薬。

20 (2) モノクローナル抗体が、配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含むものである前記に記載の乳癌治療薬。

25 (3) 抗腫瘍性物質を内包するリポソームの表面に抗体を結合させることにより、抗体に抗腫瘍性物質が会合している前記に記載の乳癌治療薬。

(4) 脂質末端の一部がマレイミド化されたりリポソームに、抗体をチオエーテル基を介して結合させることにより、リポ

ソームの表面に抗体が結合している前記に記載の乳癌治療薬。

(5) 抗体の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 0 .

1 ~ 2 モル % である前記に記載の乳癌治療薬。

5 (6) マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより、リポソームの表面に抗体が結合している前記に記載の乳癌治療薬。

(7) リポソームの表面にさらにポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合した前記に記載の乳癌治療薬。

10 (8) ポリアルキレングリコール部分を含む化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 50 モル % である前記に記載の乳癌治療薬。

15 (9) マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより、リポソームの表面にポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合している前記に記載の乳癌治療薬。

(10) ポリアルキレングリコール部分がポリエチレングリコール部分である前記に記載の乳癌治療薬。

20 (11) ポリアルキレングリコール部分を含む化合物が 2 つのポリエチレングリコール部分を有する化合物である前記に記載の乳癌治療薬。

(12) ポリエチレングリコール部分の分子量が 2,000 ~ 7,000 ダルトンである前記に記載の乳癌治療薬。

25 (13) 抗体が F ( a b )<sub>2</sub> フラグメントである前記に記載の乳癌治療薬。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、GAH 抗体の乳癌細胞株に対する増殖抑制効果を

検討した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

5 本発明の乳癌治療薬は、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含むヒトモノクローナル抗体と、この抗体に会合した抗腫瘍性物質とを含む。

10 本発明において、乳癌治療薬とは、用いる抗体が反応性を示す細胞または組織を含む乳癌に対する抗腫瘍剤を意味する。

本発明は、GAH 抗体が乳癌組織に対する反応性を有するという知見、及び、この抗体に抗腫瘍性物質を会合させたものにより乳癌の増殖が有効に抑制されるという知見に基づいてなされたものである。GAH 抗体において、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列は、重鎖可変領域の中でも超可変領域と呼ばれ、同様に配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列は、軽鎖可変領域の中でも超可変領域と呼ばれる。かかる領域は、免疫グロブリンの抗体としての特異性、抗原決定基と抗体の結合親和性を決定するものであり、相補性決定部とも呼ばれる。従って、かかる超可変領域以外の領域は他の抗体由来であっても構わない。すなわち、GAH 抗体と同様の超可変領域を有する抗体は GAH 抗体と同様に本発明において使用できると考えられる。

25 従って、本発明に使用されるヒトモノクローナル抗体は、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含むものである。これらのアミノ酸配列は、通常、重鎖及び軽鎖の各鎖の 3 つの超可変領域に、N 末端側から、配列表の配列番号 1、2 及び 3 並びに配列表

の配列番号 4、5 及び 6 の順でそれぞれ含まれる。本発明においては、乳癌組織との反応性を損なわない範囲で一部のアミノ酸を置換、挿入、削除あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明において使用できるモノクローナル抗体に含まれる。

本発明において使用されるヒトモノクローナル抗体は、癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製し、上記の特定のアミノ酸配列を有するものを選択することによって得ることができる。

ハイブリドーマは、A. Imamらの方法[Cancer Research 45, 263 (1985)]に準じて、まず、癌患者から摘出された癌所属のリンパ節から、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールを用いてマウスミエローマ細胞と融合して得られる。得られたハイブリドーマの上清を用いて、パラフォルムアルデヒド固定した各種癌細胞株に対し、エンザイムイムノアッセイにより陽性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングを行う。

さらに、ハイブリドーマの上清から、常法[R. C. Duhamelら、J. Immunol. Methods 31, 211 (1979)]によりモノクローナル抗体を精製し、蛍光物質でラベルし、生癌細胞株、各種の赤血球、白血球等に対する反応性をフローサイトメトリーで検出することにより、生癌細胞株に対しては反応性を示す抗体を、赤血球、白血球に対しては、反応性を示さない抗体を選別する。また、癌患者から摘出される癌組織から単離される癌細胞、および同一患者の同一組織の非癌部から単離される正常細胞に対する反応性を比較して、癌細胞に、より多量の抗体が結合し、正常細胞には反応がないか、もしくは健常人由来の抗体と同程度の反応性しかない抗体を選別する。

かくして選別されたハイブリドーマが産生する抗体をコードするDNAの塩基配列は、たとえば、以下の方法によって得られる。抗体産生ハイブリドーマから、チオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法〔Casaraら, DNA, 2, 329 (1983)〕でmRNAを調製して、オリゴ(dT)プライマーを用いてそのcDNAライブラリーを作製する。次いで、cDNAに(dG)テーリングを行い、このdGテールにハイブリダイズするポリCと、既に遺伝子が取得されているヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の各々共通な配列部分をプローブとしてPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。その後、DNAの末端平滑化を行い、電気泳動法によってゲルから切りだしたDNAをpUC119等のクローニングベクターに挿入し、Sangerらのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)〕によってその塩基配列が決定される。この塩基配列に基づいて、上記特定のアミノ酸配列を有するものを選別できる。

また、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、遺伝子工学的な手法により作製することもできる。

本発明において特に好適なモノクローナル抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が夫々配列表の配列番号7および8のアミノ酸配列で表されるものである。重鎖および軽鎖の定常領域の塩基配列は、例えばNucleic Acids Research 14, 1779 (1986)、The Journal of Biological Chemistry 257, 1516 (1982)およびCell 22, 197 (1980)に記載のものと同じ配列を有するものでよい。

本抗体は、本抗体を産生するハイブリドーマを牛胎児血清含有eRDF、RPMI 1640培養液等を用いて培養する



か、または、上記の特定の超可変領域を含む可変領域をコードするDNAにさらに重鎖および軽鎖の定常領域をコードするDNAが夫々連結された遺伝子を化学合成し、その遺伝子の発現を可能とする公知の種々の発現ベクター、例えば、動物細胞における発現ベクターとして、pKCRH2〔三品ら、Nature, 307, 605 (1984)〕から特開平 5-304987 号公報の図 1 または図 2 に示した手順で構築することができる pKCR (ΔE) / H と pKCRD に挿入し、CHO 細胞（チャイニーズハイスター 卵巣細胞）等の宿主中で発現させることにより得ることができる。例えば、重鎖遺伝子の両端に Hind III 部位を付加したものを pKCR (ΔE) / H の Hind III 部位に挿入し、またこのプラスミドの Sal I 部位に DHFR 遺伝子等の選択マーカー遺伝子を挿入する。一方、軽鎖遺伝子の両端には EcoRI 部位を付加したものを pKCRD の EcoRI 部位に挿入し、さらにこのプラスミドの Sal I 部位にも DHFR 遺伝子を挿入する。両プラスミドを CHO d h f r -〔Urlaub G. & Chasin L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980)〕等の細胞にリン酸カルシウム法で導入し、ヌクレオチドを含まない αMEM 培養液等で増殖する細胞から、さらに抗体を産生する細胞を選別することによって得ることができる。抗体は、これらの細胞を培養した培養液から、プロテイン A をセルロファイン、アガロース等の支持体に結合させたカラム等に吸着し、溶出させること等によって精製される。

抗体としては、全長抗体（抗体全体）又は抗体断片（抗体フラグメント）、又は抗体誘導体などを用いることができる。本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗体全体及び抗体フラグメント（例えば、F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, scFv（一本鎖抗体）など）のほか、誘導体化又は修飾した抗体などを

包含しており、最も広義に解釈しなければならない。

ヒトモノクローナル抗体は、本発明の乳癌治療薬をヒトに投与する場合、異種動物の蛋白質ではない点で有利である。

5 本発明に使用される抗腫瘍性物質の種類は特に限定されないが、例えば、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、5-フルオロウ  
10 ラシル（5-FU）等の抗腫瘍剤（抗癌剤）；リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素；アンチセンスRNA；並びにそれらの薬学的に許容し得る塩及び誘導体などを用いることができる。これらの物質は、市販品を購入するか、または、それぞれ公知の方法により適宜製造することにより得ることができる。

15 上記の薬学的に許容し得る塩としては、薬学的に許容し得る多価陰イオン性物質との塩、例えば、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩、及びそれらの誘導体との塩が好ましい。

抗体と抗腫瘍性物質との会合は、抗体と抗腫瘍性物質を化学的に結合する方法、リボソームに抗腫瘍性物質を封入し、そのリボソームの表面に抗体を結合する方法等、当業者に利用可能な方法によって行うことができる。

20 本発明の乳癌治療薬においては、抗腫瘍性物質を内包するリボソームの表面に抗体を結合させることにより、抗体に抗腫瘍性物質が会合していることが好ましい。

25 リボソームを構成する脂質としては、例えば、天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン）やジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）、ジミリストイルフォスファチジルコリン（DMP C）、ジステアロイルフォスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルフォスファチジルエタ

ノールアミン (D P P E)、ジオレオイルフォスファチジルエ  
タノールアミン (D O P E)、ジパルミトイルフォスファチジ  
ン酸 (D P P A)、ジパルミトイルフォファチジルグリセロー  
ル (D P P G)、ジミリストイルフォスファチジン酸 (D M P  
5 A) 等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の  
糖脂質、脂肪酸、両親媒性ジアルキルジメチルアンモニウム  
(dialkyl dimethylammonium amphiphiles)、ポリグリセロー  
ルアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル  
等 (Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993)、  
10 アルキルグリコシド、アルキルメチルグルカミド、アルキル  
シュークロースエステル、ジアルキルポリオキシエチレンエ  
ーテル、ジアルキルポリグリセロールエーテル等 (Liposome  
Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993)、ポリオキシエチ  
レンーポリ乳酸等の両親媒性ブロック共重合体等 (特表平  
15 6-508831 号公報) などを挙げることができるが、これらに限  
定されることはない。これらの脂質は単独で、又は 2 種以上  
を組み合わせて用いることができ、さらにコレステロール等  
の非極性物質、D C - c h o l ( 3  $\beta$  -[N-(N',N'-  
dimethylaminoethyl)carbonyl]cholesterol) 等のコレステロ  
20 ール誘導体と組み合わせ用いてもよい。

リポソームにおいては、ポリアルキレングリコールを含む  
化合物及び必要に応じて抗体などの蛋白質の結合のために、  
脂質成分の一部として、例えばマレイミド化フォスファチジ  
ルエタノールアミンなどのマレイミド化された脂質 (本明細  
25 書において「マレイミド化脂質」と呼ぶ。) を用いることが好  
ましい。全脂質に対するマレイミド化脂質の割合は、通常、  
約 0.5 ~ 10 モル% である。

マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンの例で説  
明すると、この化合物はアミノ基に反応性を有するマレイミ

ド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基との反応により得られる。該マレイミド含有化合物はカプロイル基、ベンゾイル基、フェニルブチリル基等の残基を含んでいてもよく、例えば、N-( $\epsilon$ -マレイミドカ  
5 プロイルオキシ)スクシンイミド、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、N-( $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド等を挙げることができる。PEとしてはジパルミトイルフォスファ  
10 チジルエタノールアミン(DPPE)、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン(DOPE)等のフォスファチジルエタノールアミン類が使用できるが、好ましくはDPPEである。脂質成分として、さらにステアリルアミン、ジ  
15 セチルフォスフェートなどの荷電性物質を含んでいてもよい。また、リポソームは、ウイルスの一部または全部を組み込んだ融合リポソーム、例えばセンダイウイルスとリポソームを融合したリポソームであってもよい。

典型的なリポソームとしては、例えば、フォスファチジル  
20 コリン1モルに対して、コレステロールを0.3~1モル、好ましくは0.4~0.6モル、マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンを0.01~0.2モル、好ましくは0.02~0.1モル、さらに好ましくは0.02~0.05モルを含む脂質組成物を用いることができ、フォスファチ  
25 ジン酸を加える場合には0.4モル以下、好ましくは0.15モル以下の脂質組成物を用いることができる。

リポソームの製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。また、リポソームの形態も特に限定されず、いかなる形態であってもよい。例えば、

ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え、機械的振盪を加えて形成するマルチメラリポソーム (MLV); 超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法により得られるスモールユニメラリポソーム (SUV); 界面活性剤除去法、逆相蒸発法 (リポソーム、砂本順三ら、南江堂、1998)、MLVを均一孔径を有するメンブランから加圧により押し出すエクストルージョン法等によって得られるラージユニメラリポソーム (LUV) のいずれであってもよい (Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993)。リポソームの粒径は、例えば、300 nm 以下、好ましくは30から200 nm 程度である。

リポソームには抗腫瘍性物質が封入される。抗腫瘍性物質をリポソームに導入する方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。例えば、リポソーム形成時に水溶液として添加してリポソーム内部に封入してもよい。また、リポソーム形成後、ベジクル内外にpH勾配などの濃度勾配を形成し、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な抗腫瘍性物質をリポソーム内部に取り込ませる方法 (Cancer Res., 49, 5922, 1989; BBA, 455, 269, 1976) などを用いることができる。

リポソームの表面に抗体を結合させる方法としては、精製抗体に疎水性の物質を結合させ、リポソームに挿入する方法、ホスファチジルエタノールアミンと抗体とをグルタルで架橋させる方法等があるが、好適には、抗体にチオール基を付与した後、リポソームのマレイミド基と該チオール化抗体とを反応させることによって、リポソームを抗体で修飾する方法が挙げられる。抗体へのチオール基の付与は、抗体のアミノ基に対して、蛋白質のチオール化に通常用いる N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピネート (SPDP)

(Carlsson, J., et al., Biochem. J., 173, 723, 1978) やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート (Traut, R.R., et al., Biochemistry, 12, 3266, 1973) 等の化合物を反応させる方法により行なうことができる。

- 5        また、抗体由来のイオウ含有基、すなわち、抗体の内在性ジオール基を反応させることもでき、抗体活性の維持の点から内在性ジチオール基を用いる方法は好適である。抗体の内在性ジチオール基は、それを還元してチオール基とすることによりマレイミド基と反応させることができる。例えば、I
- 10        g Gを用いる場合はペプシン等の酵素で  $F(a b')_2$  化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られる  $F a b'$  に生じるチオール基をリポソームとの結合反応に利用することができる (Martin, F.J., et al., Biochemistry, 20, 4229, 1981)。
- 15        I g M の場合には、ミラーらの方法 (J. Biol. Chem., 257, 286, 1965) に準じ、緩和な条件で J 鎖を還元して得られる I g M s の F c 部分のチオール基をリポソームとの結合に利用すればよい。特開平 5-304987 号公報に記載された G A H 抗体を用いる場合には、 $F(a b')_2$  を用いることが好適である。チオール基が付与された抗体などの蛋白質とマレイミド基を
- 20        含むリポソームとの結合は、通常には、中性の緩衝液 (p H 6. 5 ~ 7. 5) 中で 2 ~ 16 時間反応させることにより達成される。

- 25        リポソームは、その表面に、ポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合していることが好ましい。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリプロピレングリコールなどを用いることができるが、ポリエチレングリコールを用いることが好ましい。ポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量が 2, 0 0 0 ~ 7, 0 0 0 ダルトン程度のもの、好ましくは約 5, 0

00ダルトン程度のものを用いることができる。

リポソームは、上記ポリアルキレングリコール部分を含む化合物がリポソーム表面のマレイミド化脂質にチオエーテル結合を介して結合した形態を有していることが好ましい。この場合には、通常、ポリアルキレングリコール部分を含む化合物にチオール基を導入した後、この化合物をリポソームのマレイミド基と反応させることにより、ポリアルキレングリコールを結合させたりポソームを製造することができる。ポリアルキレングリコール部分を含む化合物としては、通常、  
5 ポリエチレングリコール基を有し、かつ末端にチオール化可能な化合物又は末端にメルカプト基を有する化合物を挙げることができる。具体的には、例えば、ポリアルキレングリコール基をトリアジンに結合した化合物、さらに該トリアジンがアミノ酸などにより置換された化合物を挙げることができる。この際、ポリアルキレングリコール基を2つ有する化合物（2本鎖）であってもよい。

チオール基が導入されたポリアルキレングリコール部分を含む化合物の製造には、ポリアルキレングリコールとしてポリエチレングリコールを用いる場合には、例えば、モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸とを脱水縮合する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにSPDPでピリジルジチオプロピオニル基を導入し、さらに還元する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオール基を導入する方法；モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合させる方法；ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと縮合する方法などを利用することができる。さらに具体的には、2,4-ビス（ポチエチレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化PEG  
20  
25

2 (生化学工業株式会社製))をシスチンと反応させ、さらに還元してシステイン結合活性化PEG2を得ることができる。

5 リポソームにおけるポリアルキレングリコール部分を含む化合物の結合量は特に限定されず、残存マレイミド化脂質に対して過剰に反応させてもよいが、ポリアルキレングリコールの好ましい結合量としては、全脂質に対して0.28~0.90モル%程度、より好ましくは0.28~0.56モル%程度、マレイミド化脂質に対しては15~50モル%程度、より好ましくは15~30モル%程度であり、DPPCに対して0.44~1.45モル%程度、より好ましくは0.44~0.89モル%程度である。

15 本発明の好ましい実施態様では、抗体及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合されたりポソームが使用され、これを製造するためには、まず、マレイミド基を有するリポソームに対して中性の緩衝液中でチオール化抗体を反応させる。例えば、リポソームを構成する全脂質100mgあたり0.5~5.3mg、好ましくは0.5~4.5mg、より好ましくは1.2~2mgの抗体が結合するように、すなわちチオール化抗体をマレイミド基(マレイミド化脂質)  
20 1モルに対して、0.1モル%から約2モル%程度、好ましくは0.1~1.6モル%、より好ましくは0.4~0.7モル%反応させればよい。ついで、残存しているマレイミド基に対してチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を反応させ、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合したりポソームを製造することができ、  
25 具体的には、マレイミド化脂質基1モルに対して、15モル%から50モル%、好ましくは15~30モル%(全脂質に対して0.28~0.90モル%、好ましくは0.28~0.56モル%、DPPCを用いる場合には、DPPCに対して



0.44~1.45モル%、好ましくは0.44~0.89モル%)のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を加え、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合したりポソームを製造することができる。

- 5 抗体が結合した腫瘍性物質含有リポソームは、公知の方法、例えば、脱水法(特表平2-502348号公報)、安定化剤を加え液剤として用いる方法(特開昭64-9331号公報)、凍結乾燥法(特開昭64-9931号公報)等により製剤化することができ、
- 10 乳癌の治療のために、血管内投与、局所投与などの方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の抗腫瘍性物質の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルビシンを封入したりポソームを投与する場合には、有効成分量として50mg/kg以下、好ましくは10mg/kg以下、より好ましくは5mg/kg以下で用いることができる。
- 15

#### 実施例

- 以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるもの
- 20 ではない。

#### 実施例1 乳癌組織に対するGAH抗体の反応性

- 特開平5-304987号公報(実施例1、2、3)に記載のGAH抗体にビオチン化試薬(アマシャム社製)を用いてビオチン化標識を行った。ヒト乳癌組織のパラフィン切片
- 25 を脱パラフィン処理し、5%-BSA/PBS溶液に室温で1時間浸してブロッキングを行った後、100μg/mlのビオチン化GAH抗体溶液と37℃で2時間反応させた。切片をPBSで洗浄し、4μg/mlのPerCP(ペリジニンクロロフィルプロテイン)標識ストレプトアビジン溶液

(Becton/Dickinson 社製) と遮光下、氷冷中で 30 分間反応させた。GAH 抗体の乳癌組織切片に対する反応性は、蛍光顕微鏡を用い、励起波長 490nm における 680nm の PerCP の赤色蛍光として検出した。GAH 抗体の反応性をその特異的  
5 赤色蛍光の強度、ならびに分布から判断した結果、乳癌組織 11 例に対し、5 例の陽性反応が確認された。

乳癌細胞株 MDA-MB231、MDA-435、MDA-MB468 (大日本製薬) を培養し、それぞれの細胞をヌードマウス (5 週令オス、日本クレア) の皮下に移植した。腫瘍が約 1 cm<sup>3</sup> 程度の  
10 大きさに増殖した時点で腫瘍を摘出し、パラフィン包埋を行い組織切片を作製した。これらの乳癌組織切片に対する GAH 抗体の反応性を、上記ヒト乳癌組織切片に対する反応性検討と同様の方法を用いて行った結果、乳癌株 3 株の内、MDA-MB231 に陽性反応が認められた。

15

実施例 2 GAH 抗体結合リポソームの乳癌細胞株に対する増殖抑制効果

WO 00 / 64413 号公報 (実施例 1) に記載の方法に準じて、ドキソルビシン (DXR) (協和発酵社) を封入したり  
20 リポソームを作成し、チオール化した GAH 抗体を結合させ、さらにチオール化したポリエチレングリコール (PEG) を結合させ、抗体結合リポソームを作成した。また、これらの手順から抗体結合の操作を省くことによって抗体非結合リポソームを作成した。

25

GAH 抗体の反応性が確認された乳癌細胞株 MDA-MB231 を 96-ウェルプレートに  $5 \times 10^3$  個/ウェルの密度に播種し、10% FBS 添加した e-RDF 培地 (GIBCO BRL) で 2 日培養を行った後、培養上清を除去して DXR 量換算として  $5 \mu\text{g/ml}$  の濃度の GAH 抗体結合リポソームまたは抗体非結合リポソ

ームを 100  $\mu$ l/ウェル、各 9 ウェルに添加した。37℃で 1 時間反応を行った後、各リボソーム溶液を除去し、10% FBS 添加した e-RDF 培地を添加して培養を継続した。5 日目に細胞の生存率を比較するため、MTT (tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイ (Green, L. M., et al. J. Immunol. Methods 70:257-268, 1984)を行った。生細胞中のミトコンドリアデヒドロゲナーゼ酵素によって形成されたフォルマザンを 0.04N-HCl 添加イソプロピルアルコールで溶解し、550nm の吸光度を測定した。コントロールとしてリボソーム添加濃度が 0 のウェルの値を 100%とし、抗体結合リボソームおよび抗体非結合リボソームを添加したウェルの細胞生存率を算定した。その結果を第 1 図に示す。抗体非結合リボソームに比較して、GAH 抗体結合リボソームでは、さらに強力な乳癌細胞の増殖抑制効果が認められた。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、抗体の特異的反応性により、胃癌、大腸癌に加え、乳癌に対しても優れた治療効果が得られる乳癌治療薬が提供可能である。

なお、本出願は、日本特許出願 特願 2001-224596 号を優先権主張して出願されたものである。

## 請求の範囲

1. 重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 の  
アミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番  
5 号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含むヒトモノクローナル抗  
体と、この抗体に会合した抗腫瘍性物質とを含む乳癌治療薬。

2. モノクローナル抗体が、配列表の配列番号 7 のアミノ酸  
配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号 8 のアミノ酸  
10 配列を含む軽鎖可変領域とを含むものである請求項 1 記載の  
乳癌治療薬。

3. 抗腫瘍性物質を内包するリポソームの表面に抗体を結合  
させることにより、抗体に抗腫瘍性物質が会合している請求  
15 項 1 または 2 記載の乳癌治療薬。

4. 脂質末端の一部がマレイミド化されたりリポソームに、抗  
体をチオエーテル基を介して結合させることにより、リポソ  
ームの表面に抗体が結合している請求項 3 記載の乳癌治療薬。  
20

5. 抗体の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 0.1  
～ 2 モル % である請求項 4 記載の乳癌治療薬。

6. マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含  
有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより、  
25 リポソームの表面に抗体が結合している請求項 4 又は 5 に記  
載の乳癌治療薬。

7. リポソームの表面にさらにポリアルキレングリコール部

分を含む化合物が結合した請求項 3 ～ 6 のいずれかに記載の乳癌治療薬。

5 8. ポリアルキレングリコール部分を含む化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ～ 50 モル%である請求項 7 記載の乳癌治療薬。

10 9. マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより、リポソームの表面にポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合している請求項 7 または 8 記載の乳癌治療薬。

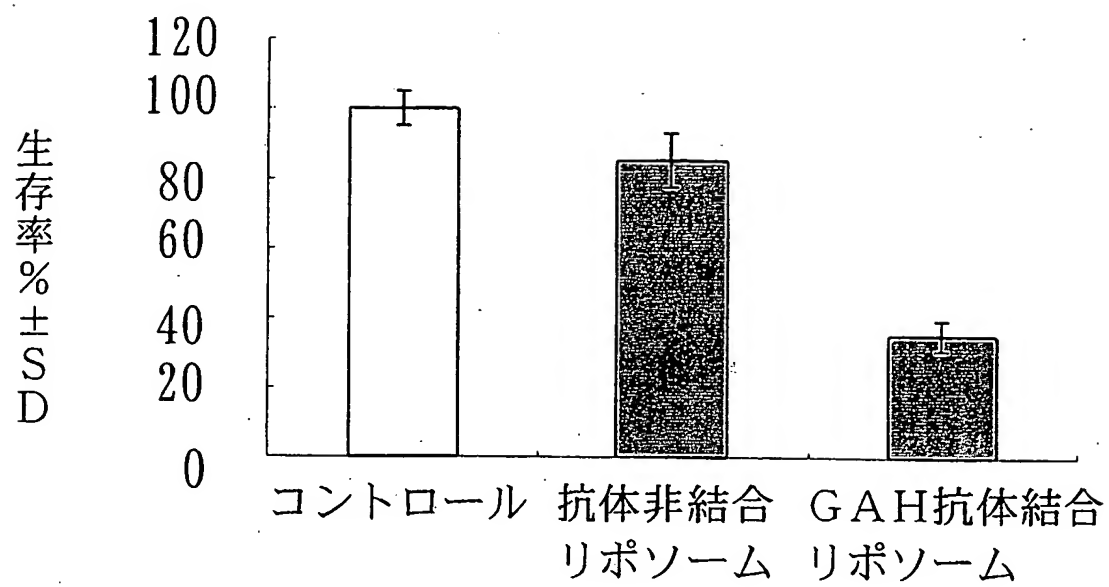
15 10. ポリアルキレングリコール部分がポリエチレングリコール部分である請求項 7 ～ 9 のいずれかに記載の乳癌治療薬。

20 11. ポリアルキレングリコール部分を含む化合物が 2 つのポリエチレングリコール部分を有する化合物である請求項 10 に記載の乳癌治療薬。

12. ポリエチレングリコール部分の分子量が 2,000 ～ 7,000 ダルトンである請求項 10 または 11 に記載の乳癌治療薬。

25 13. 抗体が  $F(ab')_2$  フラグメントである請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の乳癌治療薬。

第1図



## SEQUENCE LISTING

<110> 三菱ウェルファーマ株式会社(MITSUBISHI PHARMA CORPORATION)

<120> 乳癌治療薬

<130> 02031W00

<140>

<141>

<150> JP P2001-224596

<151> 2001-07-25

<160> 8

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn

1

5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

2/4

1 5 10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr

1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

&lt;210&gt; 6



3/4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Cys

20

25

30

Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 8

4/4

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn  
20 25 30  
Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95  
Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110  
Lys Arg

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07548

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K39/395, 45/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K39/395-39/44, 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Caplus (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 520499 A1 (Mitsubishi Kasei Corp.), 30 December, 1992 (30.12.92), & EP 520499 B1 & CA 2072249 A & DE 69224496 E & JP 5-304987 A & JP 3236667 B2 & ES 2115626 T3 & US 5767246 A & US 5837845 A & US 5990287 A & US 5990297 A & US 6139869 A	1-13
A	WO 99/55367 A1 (The Regents of the University of California), 04 November, 1999 (04.11.99), & AU 9937429 A & EP 1071460 A1 & MX 2000010440 A1 & JP 2002-513156 A & JP 2002-524024 A	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"I" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 November, 2002 (07.11.02)Date of mailing of the international search report  
26 November, 2002 (26.11.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07548

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAPAHADJOPOULOS, Demetrois et al., Targeting of drugs to solid tumors using anti-HER2 immunoliposomes, Journal of Liposome Research, November, 1998, Vol.8, No.4, pages 425 to 442	1-13
A	Masaki DOI, "Adriamycin to Monoclonal Kotai A7 tono Fukugotai no Sakusei to Hito Nyugan eno Oyo", Journal of Kyoto Prefectural University of Medicine, 25 November, 1997 (25.11.97), Vol.106, No.11, pages 1049 to 1057	1-13
A	Saiko HOSOKAWA et al., "Biotechnology to Kagaku no Yugo -Gan Targeting Ryohozai no Kaihatsu Kenkyu-", The Aromatics, 15 May, 1996 (15.05.96), Vol.48, Nos.5, 6, pages 143 to 155	1-13
A	JP 9-110722 A (Toray Industries, Inc.), 28 April, 1997 (28.04.97), (Family: none)	1-13

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/07548

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K39/395, 45/00, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K39/395-39/44, 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (DIALOG),  
WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 520499 A1 (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) 1992.12.30 & EP 520499 B1 & CA 2072249 A & DE 69224496 E & JP 5-304987 A & JP 3236667 B2 & ES 2115626 T3 & US 5767246 A & US 5837845 A & US 5990287 A & US 5990297 A & US 6139869 A	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.11.02

国際調査報告の発送日

26.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4C

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/55367 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 1999. 11. 04 & AU 9937429 A & EP 1071460 A1 & MX 2000010440 A1 & JP 2002-513156 A & JP 2002-524024 A	1-13
A	PAPAHADJOPOULOS, Demetrios et al., Targeting of drugs to solid tumors using anti-HER2 immunoliposomes, Journal of Liposome Research, November, 1998, Volume 8, Number 4, pages 425-442	1-13
A	土井正樹, アドリアマイシンとモノクローナル抗体A7との複合体の作製とヒト乳癌への応用, 京都府立医科大学雑誌, 1997. 11. 25, 第106巻, 第11号, pp. 1049-1057	1-13
A	細川斉子ほか, バイオテクノロジーと科学の融合ー癌ターゲティング療法剤の開発研究ー, アロマティックス, 1996. 05. 15, 第48巻, 第5・6号, pp. 143-155	1-13
A	JP 9-110722 A (東レ株式会社) 1997. 04. 28 (ファミリーなし)	1-13